

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Detección fenotípica de enterobacterias productoras de
betalactamasas de espectro extendido aisladas en
urocultivos de gestantes. Lima, Perú**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Víctor Raúl Huamán Cárdenas

ASESORES

Carlos Raúl Sevilla Andrade

Edgar Gonzales Escalante

Esther Valencia Bazalar

Javier Soto Pastrana

Lima - Perú

2012

CO-ASESORES:

Lic. TM. Edgar Gonzales Escalante

Lic. TM. Esther Valencia Bazalar

Lic. TM. Javier Soto Pastrana

JURADO DE SUSTENTACIÓN:

Presidenta: Lic. TM. Elizabeth Pareja Cuadros

Miembro: Lic. TM. Fredy Villanueva Cotrina

Miembro: Lic. TM. Boris Valdivia Vizarraga

Dedicado a mi madre;
Que con su gran sabiduría, temple, fortaleza y
amor incondicional sacó adelante a mí y a mis hermanas.

Lo logré mamá.

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesor de tesis **Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade**, por sus consejos, generosidad, confianza y paciencia en los momentos difíciles durante la realización de esta tesis.
- Al **Lic. Edgard Gonzales Escalante**, por orientarme, guiarme en el tan apasionante mundo de las betalactamasas y por su disposición a la enseñanza.
- Al **Dr. José María Guevara Duncan** y a la **Lic. Esther Valencia Bazalar**, por su apoyo en el laboratorio de Bacteriología del Instituto de Medicina Tropical – Universidad Nacional mayor de San Marcos (UNMSM).
- Al **Lic. Javier Soto Pastrana**, por su apoyo incondicional para el inicio de esta tesis.
- Al **Dr. Rafael Ramírez Ponce** jefe del servicio de microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen por valiosa colaboración al haberme dado las facilidades para la recolección de los aislados de las pacientes gestantes.
- Al **Dr. Jorge Alarcón Villaverde** director del Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” (IMT DAC) de la UNMSM. por su colaboración en las instalaciones del Instituto.
- A la **Lic. Maritza Puray Chávez** por su ayuda, consejos en tantos aspectos de mi vida profesional y personal, por su amistad y por haber cambiado mi visión de lo que es ser un Tecnólogo Médico.
- A **Alexandra Angulo Ramírez**, por su ayuda en los procesos moleculares en el Laboratorio de Epidemiología Molecular (IMT DAC) de la UNMSM.
- Al personal del servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen por su apoyo y amistad en estos arduos meses de trabajo.
- Al personal del Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética del IMT DAC de la UNMSM, por el apoyo de cada uno de sus integrantes.
- Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este trabajo de investigación fue financiada con el apoyo del Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado del VRI-UNMSM.
- A mi familia por su comprensión y paciencia.
- A mis buenas amigas y amigos por cada palabra de aliento.

INDICE

1. Resumen	7
2. Introducción.....	8
3. Planteamiento del problema	19
4. Objetivos.....	21
5. Materiales y métodos.....	22
6. Resultados	35
7. Discusión.....	43
8. Conclusiones.....	49
9. Recomendaciones.....	50
10. Bibliografía.....	51
11. Anexos.....	56

I. RESUMEN

Introducción El estado gestacional en las mujeres, en el cual se realizan cambios anatómicos y fisiológicos hacen propensa a las mujeres de adquirir una infección del tracto urinario (ITU). El perfil de resistencia de las gestantes esta poco estudiado.

Objetivos: Detectar fenotípicamente enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en urocultivos de gestantes. **Diseño:** Tipo

descriptivo, observacional y prospectivo. **Lugar:** Hospital Nacional Guillermo

Almenara Irigoyen. **Participantes:** Gestantes que acudieron a realizarse urocultivo en el

periodo de marzo a octubre del 2012. **Intervenciones:** Se identificaron las cepas

productoras y no productoras de BLEE con los sistemas de identificación rutinarios del

hospital, se recolectaron los aislados bacterianos con sus reportes de antibiogramas, se

realizó confirmatorio de fenotipo BLEE por el método de Jarlier a todos los aislados, se

realizó antibiograma por método de Kirby Bauer para fosfomicina y nitrofurantoina, se

almacenó a -20°C en glicerol al 20%, dos meses después se realizó PCR convencional

para tipificar molecularmente los aislados. **Resultados:** Se recolectaron 265 orinas de

gestantes de las cuales 25.2% (67) mostraron crecimiento en el cultivo. Las

enterobacterias se encontraron en 73.2% (49) dentro de ellas *Escherichia coli* ocupó el

primer lugar con 65.8% (44), seguida por *Klebsiella pneumoniae* 5.9% (4) y

Morganella morganii 1.5% (1). Por el sistema Vitek 2 compact se detectaron 19 aislados

productoras de BLEE, lo cual se traduce en una prevalencia del 38.8%. Se recuperaron

10 aislados BLEE después del almacenamiento, los genes CTX-M1 Y CTX-M2 fueron

encontrados en 70% y 10% respectivamente. **Conclusión:** Alta prevalencia de BLEE en

enterobacterias de gestantes y alta frecuencia de genes CTX-M1.

Palabras clave: Betalactamasa de espectro extendido, resistencia bacteriana, gestantes, urocultivo.

II. INTRODUCCIÓN

INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO (ITU)

La infección urinaria se refiere a toda invasión microbiana del aparato urinario que sobrepasa la capacidad de defensa del individuo afectado¹. Se incluye desde la uretra hasta los riñones y también la próstata. Por ello se menciona como pielonefritis si afecta al riñón y la pelvis renal, de cistitis si se refiere a la vejiga urinaria, de uretritis si afecta a la uretra y de prostatitis si afecta a la próstata².

La bacteriuria es la presencia de bacterias en orina, se clasifica en significativa o no, según si el número de unidades formadoras de colonia por mililitro de orina sembrada (UFC/mL) es mayor a 10^5 , pero esta definición no debe realizarse de manera taxativa y debe admitirse una cierta laxitud, depende también de la edad, sexo y síndrome clínico del paciente². Cuando la bacteriuria no se acompaña de síntomas clínicos se denomina Bacteriuria asintomática.

AGENTES ETIOLÓGICOS

En más del 95% de los casos, un único microorganismo es el responsable de la ITU³. El agente etiológico más frecuente de ITU en ambos sexos es la *Escherichia coli* (*E. coli*), responsable del 75% a 80% de casos; el 20% a 25% restante incluye microorganismos como: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella sp.* *Pseudomonas aeruginosa*. Entre los gram positivos destacan el *Streptococcus* del grupo B y *Staphylococcus coagulasa negativo*⁴. De la misma manera, estudios revelan que en la bacteriuria asintomática las enterobacterias, entre ellas la *E. coli*, seguida de *Proteus sp.* son los agentes más prevalentes⁵.

Se ha estimado en el 2002, que las infecciones bacterianas ocasionadas por bacilos gram negativos (BGN) adquiridas en ambientes hospitalarios alcanzan 1.7 millones de pacientes y ocasiona 99000 muertes, ocasionando pérdidas económicas llegando a ser la sexta causa de muerte en Estados Unidos y en Europa⁶. En el Perú entre los años 1999 y 2005 se reportó que el 10.1% de las muertes maternas fueron por infecciones⁷. Cabe resaltar también que, una de las causas de su gran mortalidad es que los BGN son eficientes en adquirir genes que codifican diferentes mecanismos de resistencia.

INFECCIONES URINARIAS EN GESTANTES

Se sabe que la infección urinaria es la patología infecciosa más frecuente en el embarazo, siendo mayor la incidencia en el primer trimestre, características como disminución de la adherencia de polimorfonucleares, disminución de la función de los leucocitos, la presión del útero en desarrollo sobre los uréteres, y el efecto de la progesterona sobre el musculo liso favorece la aparición de la ITU⁸.

La infección del tracto urinario (ITU), constituye ahora una de las infecciones más frecuentes durante el embarazo con una incidencia aproximada de 5% a un 10%⁸.

Se ha demostrado también, que las amenazas de parto prematuro tienen estrecha relación con las infecciones urinarias, tratarlas adecuadamente permite disminuir sus consecuencia⁹.

La clave para el adecuado diagnóstico de una infección al tracto urinario sintomático o asintomático en una gestante es diferenciar una verdadera bacteriuria de una contaminación. La detección de $>10^5$ UFC/mL en una muestra simple y única de orina por chorro medio es aceptada como una adecuada y práctica alternativa al criterio

original, el cual menciona que debe obtenerse un recuento de colonias $>10^5$ UFC/mL en dos colectas limpias y consecutivas de orina.

ANTIBIOTICOTERAPIA EN INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO EN GESTANTES

Tanto en las cistitis como en las pielonefritis, el tratamiento empírico debe iniciarse inmediatamente antes de disponer el resultado del urocultivo y antibiograma. Se debe valorar el riesgo del fármaco para el feto y la tasa de resistencia del centro hospitalario¹⁰.

Se pueden dividir 2 grupos de antibióticos:

1. Sin efectos nocivos conocidos sobre el desarrollo embrionario:

- Penicilinas
- Aminopenicilinas
- Carboxipenicilinas
- Cefalosporinas
- Monobactámicos

2. Con efectos nocivos, por lo tanto están estrictamente contraindicados:

- Aminoglucósidos
- Tetraciclinas
- Ácido nalidíxico

En el caso de los siguientes fármacos, se destacan algunas particularidades con respecto a su uso:

Trimetoprima / Sulfametoxazol está contraindicado en el 1º trimestre y después de las 28 semanas.

Nitrofurantoina y Sulfamidas contraindicados en el 3º Trimestre; Cloranfenicol, contraindicado antes de las 12 semanas y después de 28 semanas¹⁰.

Fosfomicina se recomienda usar después del periodo de organogénesis del feto¹¹ que va desde la semana 3 hasta la semana 12 de gestación.

MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos ha aumentado mucho en los últimos años y representa un problema de salud global¹².

Entre los principales mecanismos de resistencia bacteriana implicados tenemos:

- Inactivación enzimática
- Alteración de la permeabilidad de la membrana
- Eflujo activo de antibióticos
- Alteración del sitio de unión del antibiótico.

RESISTENCIA BACTERIANA POR INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA

Ciertas bacterias producen enzimas que neutralizan la droga o sus efectos antimicrobianos.

Las enzimas pueden ser:

Por su producción:

- Constitutivas: Producidas independientemente de la presencia del antibiótico (que cuando está presente pasa a ejercer un efecto selectivo).
- Inducibles: Estas enzimas al entrar en contacto con determinados antibióticos desencadenan o estimulan la producción enzimática masiva que inactiva al antibiótico.

Por su ubicación:

- Cromosómicas: Son aquellas enzimas cuyos genes codificantes se encuentra en el cromosoma bacteriano.
- Extra cromosómicas: Son aquellas enzimas en que los genes codificantes están localizados en elementos extracromosomales como plásmidos, transposones e integrones (este último de localización también cromosomal) ¹³.

En las gram negativas son de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas ¹⁴.

Uno de los ejemplos en los que se puede apreciar esta inactivación enzimática es con las enzimas que inactivan a los aminoglucósidos durante su transporte a través de la membrana celular en los gérmenes anaerobios gram negativos que catalizan la adenilación, acetilación y fosforilación de grupos amino e hidroxilo. Otro ejemplo es la cloranfenicol-acetiltransferasa que por medio de una reacción de acetilación inactiva al antibiótico cloranfenicol; y por último, la eritromicina esterasa hidroliza el anillo lactona de la eritromicina ¹⁵.

RESISTENCIA BACTERIANA POR BETALACTAMASAS

Las betalactamasas son denominadas así al grupo de enzimas capaces de romper el enlace amida del anillo betalactámico, con lo que el antibacteriano no puede unirse a las

proteínas fijadoras de penicilina, y no se produce el impedimento de la síntesis de la pared celular¹⁶ (mecanismo de acción del antibiótico betalactámico). La producción de betalactamasas constituye en la actualidad la principal causa de resistencia a los betalactámicos¹⁷.

Estas son producidas tanto en gram positivos como en gram negativos; mientras que en las gram positivas las betalactamasas deben ser liberadas en altos niveles debido a la dilución de las mismas en el medio externo, las producidas en las bacterias gram negativas se encuentran casi exclusivamente como enzimas solubles en el espacio periplásmico¹³, favoreciendo esto a su mayor concentración y acción sobre los antibióticos betalactámicos.

Distintos parámetros han sido utilizados en la clasificación de las betalactamasas, la más completa de estas es la de Bush y Jacoby 2010. (**ANEXO 1**).

BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

Dentro de esta clasificación el grupo 2be de K. Bush se encuentran las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) llamadas así por su capacidad de hidrolizar la cadena oximino-betalactámica presente en la droga, lo que hace que su espectro de acción se extienda a los betalactámicos de amplio espectro, como las cefalosporinas de tercera generación y/o de cuarta generación y monobactámicos (aztreonam), otra característica de este grupo es que no confieren resistencia a las cefamicinas y los carbapenémicos, y son inhibidas por el ácido clavulánico¹².

MÉTODOS DE DETECCIÓN FENOTÍPICA PARA MECANISMOS DE RESISTENCIA POR BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

La Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2011) estandarizó la metodología para las pruebas de *screening* y confirmación de cepas productoras de BLEE en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis* por el método basado en el de disco difusión mediante la técnica KirbyBauer, ambas etapas (*screening* y confirmatorio) se hacen necesarias para el reporte de cepas con producción de BLEE.

En el método de *screening* se requiere por lo menos de la utilización de los discos de cefotaxima o ceftriaxona y ceftazidima para detectar con mayor eficiencia la presencia de BLEE, se pueden usar también discos de cefpodoxima y/o aztreonam. Analizando los halos de inhibición y los puntos de corte propuestos por la CLSI (**ANEXO 2**) para el método de *screening* se sospechara la presencia de BLEE.

La confirmación fenotípica de la presencia de BLEE propuesta por la CLSI se basa en la característica de inhibición que sufren por efecto del ácido clavulánico, utilizando discos combinados de cefalosporinas de tercera generación solas como ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepima (FEP), cefpodoxima (CPD) y con ácido clavulánico. Se confirma la presencia de BLEE cuando el halo de inhibición de la combinación es mayor o igual a 5mm respecto de la cefalosporina sola¹⁸.

Además de los métodos estandarizados por la CLSI existen métodos alternativos los cuales han mostrado gran capacidad para confirmar la detección de BLEE.

Entre ellos el método de “Aproximación de Discos” descrito por Jarlier y cols. en 1988 que usa también la característica de inhibición por el ácido clavulánico y la sinergia ejercida con las cefalosporinas de tercera generación y/o cuarta generación.

Técnicamente las placas de agar MuellerHintonson inoculadas con las cepas sospechosas, con una turbidez equivalente al tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland. Se coloca un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (20/10 µg) en el centro de una placa de petri con agar MuellerHinton y alrededor, a 25 mm de distancia (centro a centro), discos de CAZ (30 µg), CTX (30 µg) y/o FEP (30 µg). La presencia de BLEE se demuestra por el efecto sinérgico del inhibidor y los discos: “efecto de huevo, cola de pez o balón de fútbol americano”¹⁹.

Debido a las ventajas no técnicas, como costos y factibilidad de su aplicación se ha recomendado el empleo del método de Jarlier²⁰.

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE PRODUCCIÓN DE BLEE POR MÉTODO AUTOMATIZADO VITEK® 2 COMPACT.

Hace aproximadamente 10 años llegaron los sistemas de identificación bacteriana y susceptibilidad antimicrobiana automatizados a nuestro medio, los cuales otorgaron un gran salto hacia la modernización del laboratorio de microbiología y con ello aumentar el número de muestras a procesar, incrementar la sensibilidad, la especificidad, la reproducibilidad de los resultados y la disminución del tiempo en la entrega de los mismos, entre otras ventajas²¹.

El sistema automatizado VITEK® 2 Compact es uno de los sistemas automatizados de identificación bacteriana y susceptibilidad antimicrobiana muy empleados en nuestro medio. Este sistema utiliza un formato de tarjetas: las tarjetas de identificación y de

susceptibilidad, en ambas se identifica el crecimiento bacteriano mediante colorimetría avanzada que detecta cinéticamente el cambio de color en los sustratos de cada tarjeta²².

La tarjeta de identificación de gram negativos(GN) VITEK®2 está diseñada para la identificación automatizada de los bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores más significativos. Estas se basan en métodos bioquímicos los cuales usan sustratos desarrollados para medir la utilización de la fuente de carbono y las actividades enzimáticas. Existen 47 test bioquímicos y un pocillo de control negativo, en cada tarjeta; se obtienen resultados finales en aproximadamente 10 horas.

El sistema VITEK®2 Compact identifica un organismo mediante una metodología basada en las características de los datos y el conocimiento acerca del organismo y las reacciones que se analizan. En el sistema existen datos suficientes de cepas conocidas como para estimar las reacciones típicas de las especies solicitadas frente a un juego de perfiles bioquímicos discriminantes. Si no se reconoce un patrón de identificación único, el sistema presenta una lista de organismos posibles o se determina que la cepa está fuera del alcance de la base de datos²².

La tarjeta de susceptibilidad AST para el sistema VITEK® 2 compact representa una metodología de test automatizado basado en la técnica de la concentración mínima inhibitoria(CMI) descrita por MacLowry y Marsh²³ y Gerlach²⁴.

Tradicionalmente, las CMI se han determinado mediante diluciones 1:2 seriadas de antimicrobiano en distintas concentraciones. En este sistema, la CMI se determina a partir del valor más bajo de concentración en la que se produce inhibición del crecimiento. Entonces se puede asignar un criterio de interpretación (sensible, intermedio o resistente) a los resultados de CMI para facilitar la orientación terapéutica. La tarjeta AST es básicamente una versión miniaturizada y abreviada de la

técnica de dilución doble para las CMI determinadas mediante el método de microdilución²⁴. Cada tarjeta AST contiene 64 micropocillos. Un pocillo de control, que contiene sólo medio de cultivo microbiológico, se encuentra presente en todas las tarjetas, mientras que los pocillos restantes contienen concentraciones de un antibiótico específico combinado con el medio de cultivo. El instrumento controla el crecimiento de cada pocillo de la tarjeta durante un período de tiempo determinado (hasta 18 horas para bacterias y hasta 36 horas para levadura). Al final del ciclo de incubación, se determinan los valores de la CMI (o los resultados del test, según corresponda) para cada antimicrobiano contenido en la tarjeta²².

Para la detección de mecanismos de resistencia asociada a producción de BLEE las tarjetas de susceptibilidad para gram negativos (AST-GN45) utilizan tres cefalosporinas (dos de tercera y una cuarta generación) y su respectiva combinación con ácido clavulánico a determinadas concentraciones (tabla 1).

Tabla 1. Antimicrobianos usados para confirmación de BLEE en sistema VITEK® 2 Compact.

CEFALOSPORINA	CEFALOSPORINA / ÁCIDO CLAVULÁNICO
Cefotaxima (0.5µg.)	Cefotaxima/ácido clavulánico (0.5µg/4µg)
Ceftazidima (0.5µg.)	Ceftazidima/ácido clavulánico (0.5µg/4µg)
Cefepima (1µg.)	Cefepima/ácido clavulánico (1µg/10µg)

Un patrón de resistencia a por lo menos una de las cefalosporinas asociado a la sensibilidad de su respectiva combinación con ácido clavulánico confirma la presencia de producción de BLEE²⁵.

El método confirmatorio utilizado en los sistemas VITEK® 2 Compact ha demostrado una buena performance en la detección de cepas productoras de BLEE alcanzando niveles de sensibilidad y especificidad de 99.5% y 100% respectivamente^{26, 27}.

EVIDENCIA DE BLEE EN GESTANTES

Existe poca bibliografía de *Escherichia coli* y otras enterobacterias BLEE positivas aisladas de pacientes gestantes²⁸.

En un estudio prospectivo de 5 años en Aligarch, India con 4290 muestras de orina de gestantes que mostraron cultivo positivo, en la que se encontró 3315 muestras con crecimiento de enterobacterias en cultivo, se confirmaron un total de 1190 aislados productoras de Betalactamasas de espectro extendido, de las cuales 846 pertenecían a aislamientos de *Escherichiacoli* y 344 a *Klebsiella pneumoniae* resultando en una prevalencia del 35.9%²⁹.

Otro estudio en India que comprendió el periodo de 5 meses desde noviembre del 2011 a marzo del 2012, se procesaron 205 muestras de pacientes en diferentes estadios de gestación, encontrándose en 60 de ellos crecimiento en el urocultivo, de estos 38 fueron por *Escherichia coli* y 5 por *Klebsiella sp.* Finalmente se encontró un total de 19 cepas productoras de BLEE, 17 en *E. coli* y 2 en *Klebsiella sp.* Lo que resulta en una prevalencia del 44.1%³⁰.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección de vías urinarias es una de las complicaciones médicas más frecuentes en el embarazo; los cambios fisiológicos asociados al embarazo predisponen al desarrollo de complicaciones que pueden afectar significativamente a la madre y al feto. No obstante del desarrollo de nuevos antibióticos la infección de vías urinarias continúa asociándose a morbilidad elevada a nivel materno y fetal³¹.

Se ha relacionado también la bacteriuria asintomática con la posterior evolución hacia una infección de las vías urinarias en gran porcentaje de gestantes.

Dentro de los patógenos más frecuentemente aislados en las infecciones urinarias sintomáticas y bacteriuria asintomáticas se encuentran las enterobacterias y entre ellas como principal representante la *Escherichia coli* (75%), seguida por otras enterobacterias como *Proteus sp.* y *Klebsiella sp.*⁴.

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública, varios son los mecanismos de resistencia en la que resalta la modificación química del antibiótico o hidrólisis enzimática principalmente por betalactamasas en enterobacterias.

Las enzimas hidrolíticas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son codificadas por plásmidos, transposones e integrones y con el uso de antibióticos para el tratamiento de las infecciones bacterianas intrahospitalarias y adquiridas en la comunidad, van ejerciendo presión selectiva, seleccionando a los clones resistentes.

Durante los últimos años se va observando crecientes y múltiples patrones de resistencia entre las cuales destacan las asociadas a BLEE en infecciones urinarias provenientes de pacientes hospitalizados y ambulatorios, ocasionando fracasos terapéuticos y el incremento de la mortalidad en este grupo de pacientes.

Se hace necesario entonces la determinación de los principales agentes bacterianos involucrados así como también la detección fenotípica de los mecanismos de resistencia que estos expresan como es el caso de las BLEE principalmente. Es por ello que se plantea la siguiente interrogante: ¿cuál es la prevalencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas en urocultivos de gestantes atendidas en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen?

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Detectar fenotípicamente enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en urocultivos de gestantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar cepas productoras de BLEE en urocultivos de gestantes por método automatizado Vitek 2 Compact.
- Confirmar cepas productoras de BLEE en urocultivos de gestantes por método estandarizado de Jarlier.
- Describir la resistencia acompañante a los principales antibacterianos empleados en la terapéutica contra las infecciones urinarias en gestantes en las cepas productoras de BLEE aisladas.
- Calcular la prevalencia de enterobacterias con producción de BLEE en urocultivo de gestantes atendidas durante el periodo de enero a octubre del 2012 en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.
- Tipificar molecularmente por PCR los genes *bla*_{CTX-M1} y *bla*_{CTX-M2} de los aislados BLEE en urocultivo de gestantes.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio es de tipo descriptivo, observacional y prospectivo.

POBLACIÓN

Urocultivos de gestantes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen en el periodo de marzo a octubre del 2012.

MUESTRA

Aplicando la fórmula de Yamane³², para poblaciones finitas el número de muestras sería:

$$n = N/(1+Ne^2)$$

Donde:

- n: Número de muestras
- N: Población
- e: Máximo error aceptable.

Considerando N= 530 urocultivos de gestantes al año en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, un máximo error aceptable de 5% y nivel de confianza del 95%, se obtiene n= 230 urocultivos de gestantes a muestrear.

El tipo de muestreo fue no aleatorio por conveniencia.

VARIABLES

Variable independiente:

Urocultivo de gestantes.

Variable dependiente:

Enterobacterias aisladas productoras de betalactamasas de espectro extendido.

TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

La técnica a utilizar fue la observacional, como instrumento se realizó el llenado de los datos a partir de los resultados de antibiograma de urocultivos del servicio de microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen en hojas de trabajo codificadas, en las cuales se obtenga información relevante de las colonias aisladas y las gestantes. **(ANEXO 3)**

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

Los siguientes criterios son válidos para realizar el estudio fenotípico en los aislados BLEE y no BLEE.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Urocultivos de gestantes con aislamiento de enterobacterias.
- Urocultivos de gestantes con recuento mayor a 10^5 UFC/mL.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Urocultivos contaminados (aquellos que mostraron crecimiento de más de un tipo de colonia en la siembra primaria y/o luego de la reactivación para el estudio fenotípico – molecular).
- Urocultivos sin identificación.

PLAN DE ANÁLISIS

Coordinación con los servicios de microbiología y aprobación de las sedes hospitalarias.

Se realizó las coordinaciones con el jefe del servicio de microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen así como también con la oficina de investigación y docencia del hospital para el acceso a las cepas aisladas y almacenadas de los urocultivos de las gestantes.

Métodos Microbiológicos:

COLORACIÓN GRAM

Paralelamente al cultivo se realizó la coloración gram de la orina homogenizada por rotación manual. La observación al microscopio a 1000X en aceite de inmersión de bacilos gram negativos fue reportada en cruces.

AISLAMIENTO PRIMARIO

Las muestras de orina fueron sembradas según protocolo del Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen en agar sangre y agar Mac Conkey con aza calibrada de 1µL. por el *método de Kass*; después de una incubación en condiciones aeróbicas a 37°C por 24 horas se realizó el recuento de colonias y la identificación de la bacteria aislada como gram negativa en los agares sangre y Mac Conkey respectivamente. Se tomó en consideración a las cepas que fueron gram negativas y tengan un recuento de colonias mayor de 10⁵ UFC/mL de orina (UFC: unidades formadoras de colonias).

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y DETECCIÓN DE AISLADOS DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BLEE POR EL MÉTODO AUTOMATIZADO VITEK® 2 COMPACT

Los aislados se procesaron por el sistema automático VITEK®2 compact (bioMérieux, Francia) por medio de las tarjetas de identificación bacteriana y de susceptibilidad AST-GN45.

Este sistema automatizado empleó su método de confirmación para bacterias gram negativas con producción de BLEE, cuando no detectó crecimiento con las cefalosporinas

de tercera y/o cuarta generación y luego detectó crecimiento con sus respectivas combinaciones con ácido clavulánico a las concentraciones dadas en la tabla 1.

La confirmación del fenotipo BLEE por el método automatizado VITEK® 2 Compact dividió a los aislados en dos grupos: aislados BLEE y aislados no BLEE.

RECOLECCIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS BLEE Y NO BLEE

Para la recolección y transporte de los aislados a estudiar, tanto en el laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética como en el laboratorio de bacteriología del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión – UNMSM (IMT-DAC) se prepararon agar tripticasa soya (TSA) los cuales fueron depositados en crioviales en condiciones de esterilidad usando una cabina de bioseguridad tipo 2.

Se recolectó en los crioviales con agar TSA por método de siembra en puntura los aislados BLEE y los no BLEE provenientes de aislamientos bacterianos ya identificados y reportados de urocultivos de gestantes, así como también sus reportes de antibiograma provenientes del sistema VITEK® 2 Compact, del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Luego de ello se refrigeraron a 4°C y se trasladaron a los laboratorios de bacteriología del IMT-DAC.

ALMACENAMIENTO DE AISLADOS BLEE.

Para el almacenamiento de los aislados en el laboratorio de bacteriología del IMT-DAC. Todas las cepas recolectadas fueron sembradas en placas petri por el método de dispersión agotamiento en agar TSA. Después de 24 horas de incubación a 37°C se observó crecimiento en todas las placas.

Se prepararon en condiciones de esterilidad caldo tripticasa soya y se añadió glicerol previamente autoclavado, en volúmenes suficientes para conseguir caldo tripticasa soya

con glicerol al 20%. Se repartió la mezcla en crioviales. Se inoculó por el método de punción las cepas reactivadas en el caldo tripticasa soya con glicerol al 20% y se procedió a su almacenamiento a -20°C en congelación.

CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE PRODUCCIÓN DE BETALACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO POR MÉTODO DE JARLIER.

En el laboratorio de bacteriología del IMT-DAC los aislamientos BLEE fueron sembrados en agar TSA por dispersión agotamiento e incubados por 24 horas a 37°C luego de ello se inocularon por puntura 3 a 4 colonias en solución salinaestéril hasta llevarlo a una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de Mac Farland. Se sembró, utilizando un hisopo estéril, en tapete todas las cepas en estudio en agar MuellerHinton, se colocó el disco de amoxicilina/ácido clavulánico(20µg/10µg) marca Britania, en el centro de la placa petri y luego se colocaron a distancia de 25 mm de ella los discos de ceftazidima (30µg), y cefotaxima (30µg). Se dejó incubar por 24 horas a 37°C antes de su lectura e interpretación.

DETECCIÓN DE RESISTENCIA ACOMPAÑANTE EN AISLADOS BLEE

Se realizaron los antibiogramas por el método de Kirby Bauer a todos los aislados productores de BLEE, para estudiar la resistencia a los antimicrobianos fosfomicina y nitrofurantoina. Los aislamientos BLEE fueron sembrados en agar TSA por dispersión agotamiento e incubados por 24 horas a 37°C luego de ello se inocularon por puntura 3 a 4 colonias en caldo tripticasa soya hasta llevarlo a una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de Mac Farland. Seguidamente se sembró con hisopo estéril en tapete todas las cepas en estudio en agar MuellerHinton y a continuación se colocaron los discos de fosfomicina 50µg. y nitrofurantoina 200µg. Se incubaron a 37°C por 24 horas antes de su lectura e interpretación.

TIPIFICACIÓN MOLECULAR POR PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION) DE MECANISMO DE RESISTENCIA BLEE

Se tipificó molecularmente por PCR los aislados BLEE en urocultivo de gestantes, recuperados del almacenamiento a -20°C.

Para la tipificación molecular se estudiaron 2 subgrupos de genes del grupo *bla*_{CTX-M}: Los genes estudiados fueron *bla*_{CTX-M1} y *bla*_{CTX-M2}.

Reactivación de aislados productores de BLEE

Se descongelaron los aislados almacenadas en caldo tripticasa soya con glicerol al 20%, en estufa a 37°C por media hora. Se reactivaron sembrándolas en agar TSA incubándolas por 24 horas a 37°C.

Extracción de ácidos nucleicos para bacilos gram negativos

El método para extracción de ADN bacteriano utilizado fue mediante lisis celular por calor. Se cogieron 3 a 4 colonias de cada uno los aislamientos BLEEreactivados y fueron colocadas en crioviales con 200µL. de agua *MilliQ*, luego fueron agitadas en agitador vortex y llevadas a 100°C en termo bloque por 10 minutos. Se centrifugó a 10 000 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante fue colectado en crioviales de 200 µL.

Preparación de la Master Mix

Para que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ocurra, se necesitan los siguientes reactivos: moléculas blanco de ADN doble cadena conteniendo la secuencia a amplificar, dos oligonucleótidos (primers) que flanquean la secuencia blanco, una mezcla de los cuatro deoxi-ribonucleótidos (dNTPs), los sustratos de una ADN polimerasa, y la polimerasa que cataliza la reacción de polimerización adicionando los

dNTPs a partir del extremo 3' del cebador; todo ello en presencia de un buffer adecuado. La *taq*ADN polimerasa es la polimerasa más frecuentemente usada en la de PCR y la que fue usada en el presente estudio.

La elaboración del Master mix se realizó en las instalaciones del laboratorio de epidemiología molecular y genética del IMT-DAC, utilizando cabina estéril de bioseguridad (Anexo 4.1).

Protocolo *bla*_{CTX-M1}

En la tabla 2 se observa el protocolo usado para la amplificación del gen CTX-M1.

Tabla 2. Protocolo *bla*_{CTX-M1} para elaboración de la Master Mix.

COMPONENTES DEL MASTER MIX	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN
Buffer de reacción	10X	2.5 µL
Cloruro de magnesio (Cl₂Mg)	50 µM	1.25 µL
Primer forward	10 µM	2.5 µL
Primer reverse	10 µM	2.5 µL
dNTPs	10 µM	1.25 µL
Agua MilliQ		13.0 µL
<i>Taq</i> Polimerasa.	5 U/ µL	0.2 µL
ADN lisis		2 µL
VOLUMEN		25.2 µL

Protocolo *bla*_{CTX-M2}

En la tabla 3 se observa el protocolo usado para la amplificación del gen *bla*_{CTX-M2}.

Tabla 3. Protocolo *bla*_{CTX-M2} para elaboración de la Master Mix.

COMPONENTES DEL MASTER MIX	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN
Buffer de reacción	10X	2.5 µL
Cloruro de magnesio (Cl ₂ Mg)	50 µM	1.0µL
Primer forward	10 µM	2.5 µL
Primer reverse	10 µM	2.5 µL
dNTPs	10 µM	1.0µL
Agua MilliQ		13.5µL
Taq Polimerasa.	5 U/ µL	0.2 µL
ADN lisis		2 µL
VOLUMEN		25.2 µL

Adición de ADN total bacteriano.

El ADN total extraído por calor fue adicionado al Máster mix en el área de extracción del laboratorio de epidemiología molecular y genética del IMT DAC utilizando cabina de bioseguridad tipo 2 (Anexo 4.2).

Amplificación

La amplificación de los ADN blanco se llevó a cabo en un termociclador Veriti® marca Applied Biosystems a temperaturas y tiempos de denaturación, hibridación y extensión específicos para cada grupo de genes, como se observan en la tabla 4 y tabla 5

Tabla 4. Protocolo amplificación *bla*_{CTX-M1}

TEMPERATURA		TIEMPO EN MINUTOS
DENATURACIÓN INICIAL		
95°C		5
CICLADO (30 ciclos)		
94°C	DENATURACIÓN	1
50°C	HIBRIDACIÓN	1
72°C	EXTENSIÓN	1
EXTENSIÓN FINAL		
72°C		10

Tabla 5. Protocolo amplificación *bla*_{CTX-M2}

TEMPERATURA		TIEMPO EN MINUTOS
DENATURACIÓN INICIAL		
95°C		5
CICLADO (30 ciclos)		
94°C	DENATURACIÓN	1
50°C	HIBRIDACIÓN	1
72°C	EXTENSIÓN	1
EXTENSIÓN FINAL		
72°C		10

Oligonucleótidos cebadores (primers)

Se utilizaron primers forward y reverse para cada grupo de genes: *bla*_{CTX-M1} y *bla*_{CTX-M2} (Tabla 6).

Tabla 6. Primers utilizados en la amplificación por PCR de genes *bla*_{CTX-M}

TARGET	PRIMER	SECUENCIA DE PRIMER (5'→3')	TAMAÑO DE PRODUCTO
<i>bla</i> _{CTX-M1}	F: CTX-M1	ATGGTTAAAAAATCACTGC	900 pb
	R: CTX-M1	GGTGACGATTTTAGCCGC	
<i>bla</i> _{CTX-M2}	F: CTX-M2	TTAATGATGACTCAGAGCATTC	896 pb
	R: CTX-M2	GATACCTCGCTCCATTTATTG	

Electroforesis de producto

La separación de los productos de PCR se realizó en una cámara de electroforesis horizontal.

Se preparó gel de agarosa grado molecular 1.5% en buffer TAE 1X, se agregó el gel de agarosa a 45°C en un recipiente molde y se colocó el peine para generar los pocillos en los cuales se cargó los productos de PCR.

En cada pocillo se carga 7 µL de producto amplificado mezclado con 1 µL de buffer muestra.

En la primera y última canaleta de cada corrida se añade el ladder marca Fermentas (marcador de pares de bases: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000).

Las condiciones de corrida fueron de 100 voltios con buffer de corrida 1X y por un tiempo de 55 minutos.

Coloración y documentación de geles

Al terminar la corrida, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio por 10 minutos. Luego de ello se decoloró con agua grado PCR por 10 minutos. Seguidamente fueron colocadas al transiluminador UV a longitud de onda 312nm, seguidamente fueron fotografiadas, por el sistema de documentación de geles microDOCmarca CleaverScientific, para su lectura e interpretación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se evaluó el fenotipo de resistencia a los antimicrobianos calculando el porcentaje de susceptibilidad y resistencia, así como también el porcentaje de bacterias portadoras de los genes estudiados en la tipificación molecular. Los datos obtenidos fueron organizados y procesados con el programa informático EXCEL 2007.

ÉTICA:

Se siguieron los criterios y normas de la declaración de Helsinski, y normas éticas de la Facultad de Medicina de la UNMSM. Todos los procedimientos del presente estudio tratan de preservar la integridad y los derechos fundamentales de los pacientes sujetos a investigación, de acuerdo con los lineamientos de las buenas prácticas clínicas y de ética en investigación biomédica. Se garantizó la total confidencialidad de la identidad de las pacientes de la cuales se obtuvieron los datos. Las muestras se trabajaron después de haber terminado los procedimientos de rutina. Los estudios microbiológicos para la investigación se realizaron a partir de la bacteria aislada.

VI. RESULTADOS

Para la mejor comprensión de los resultados, se dividirán estos en acápite: (i) identificación y perfil de resistencia bacteriano en gestantes del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen; (ii) detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE); (iii) detección de resistencia acompañante en aislados productores de BLEE; (iv) tipificación molecular de aislamiento productores de BLEE.

❖ IDENTIFICACIÓN Y PERFIL DE RESISTENCIA

En el presente estudio durante los 8 meses de recolección se presentaron un total de 265 orinas de gestantes para urocultivo. De las cuales 25.2% (67) mostraron crecimiento en el cultivo.

El grupo de cocos gram positivos representó solo el 26.8% (18) de los aislados bacterianos.

Las enterobacterias se encontraron en 73.2% (49) de todos los aislamientos bacterianos. *Escherichia coli* fue la bacteria que ocupó el primer lugar en aislamientos con 65.8% (44), entre las otras enterobacterias se halló *Klebsiellapneumoniae* con 5.9% (4) y *Morganella morgani* con 1.5% (1).

En la tabla 7 podemos observar la resistencia a los antibióticos de todas las enterobacterias aisladas en los urocultivos de las gestantes, mostrándose una gran resistencia a los betalactámicos así como también a las fluoroquinolonas.

Tabla 7. Resistencia antibiótica de enterobacterias en antibiograma de gestantes.

Nombre del disco de sensibilidad evaluado	% de resistencia
Ampicilina	81
Ampicilina/Sulbactam	48
Amikacina	0
Gentamicina	31
Ciprofloxacina	53
Levofloxacina	49
Cefazolina	44
Ceftriaxona	40
Ceftazidima	40
Cefepima	38
Nitrofurantoina	11
Imipenem	0
Trimetoprima/Sulfametazol	51

❖ DETECCIÓN FENOTÍPICA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO.

Pormedio del sistema automatizado Vitek® 2 Compact se detectaron un total de 19 aislados productores de betalactamasas proveniente de urocultivos gestantes en el

Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante el periodo marzo – octubre del 2012, lo cual se representa en una prevalencia del 38.8%.

En la confirmación manual por el método de Jarlier se registrótambién un total de 19 cepas productoras de betalactamasa de espectro extendido, observándose las típicas formas de sinergia *cola de pez* y *efecto huevo* entre los discos de ceftazidima y cefotaxima con el disco de amoxicilina/ácido clavulánico como se pueden observar en la foto 1 y foto 2.

Foto 1. Confirmación fenotípica por el método de Jarlier deaislamiento de *Escherichiacoli* con producción de betalactamasa de espectro extendido. Código 04-15.



Foto 2. Confirmación fenotípica por el método de Jarlier de aislamiento de *Escherichiacoli* con producción de betalactamasa de espectro extendido. Código 19-03.



Se evidenció que la detección y confirmación fenotípica de BLEE por el sistema Vitek® 2 Compact fue congruente al 100% con la confirmación de producción de BLEE por el método de Jarlier.

En suma, de estos aislamientos 8 fueron de pacientes hospitalizadas, 6 fueron aisladas de pacientes que acudieron por consulta ambulatoria y 5 fueron aisladas de pacientes en el servicio de emergencia obstétrica.

El 100% de los aislamientos BLEE fueron en *Escherichia coli*, encontrándose en este estudio como la única bacteria productora de este tipo betalactamasa.

❖ DETECCIÓN DE RESISTENCIA ACOMPAÑANTE EN AISLADOS PRODUCTORES DE BLEE

En la gráfica 1 podemos observar lamultiresistencia que se asocia a la producción de BLEE, sobre todo la resistencia a las fluoroquinolonas representadas por la ciprofloxacina, así como a la asociación de un betalactámico con un inhibidor de la betalactamasa(Ampicilina /Sulbactam).

En el grupo de los aminoglucósidos se observa que las bacterias productoras de BLEE presenta una marcada resistencia a la gentamicina, sin embargo con amikacina la sensibilidad fue del 100%.

La fosfomicina y nitrofurantoina evaluadas por método antibiograma manual de Kirby Bauer presentaron buena actividad frente a los aislados BLEE (foto 3), presentando niveles de sensibilidad del 90% y 63% respectivamente.

Las carbapenems representadas por el imipenem mostraron una actividad del 100%.

GRÁFICA 1. Patrón de susceptibilidad antimicrobiana en bacterias productoras de BLEE.

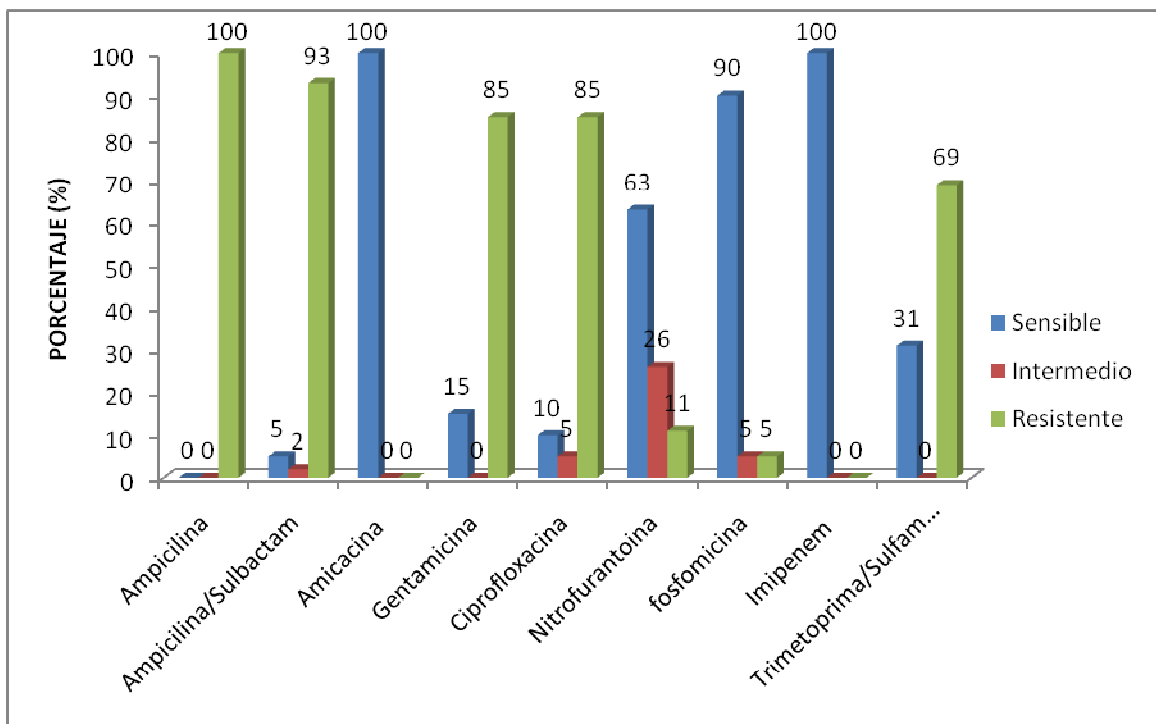
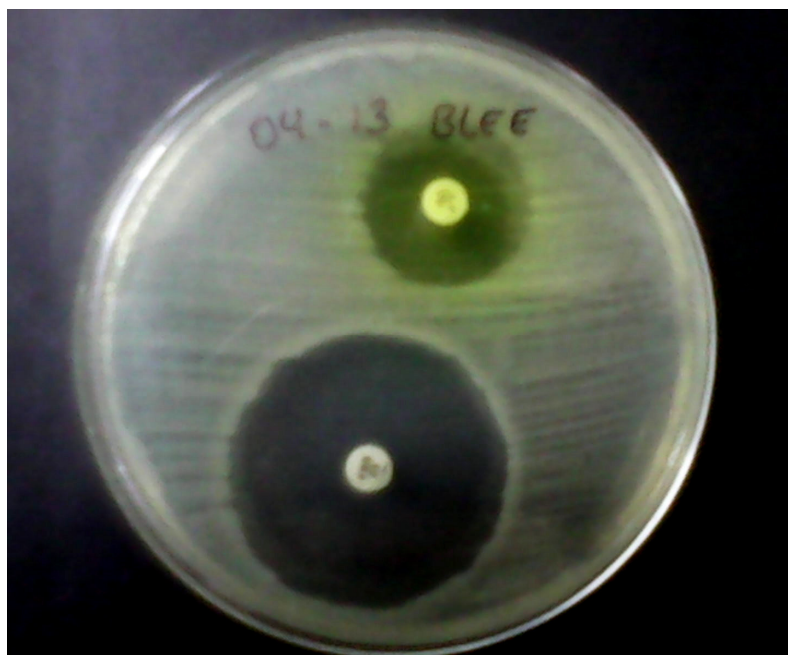


Foto 3. Evaluación por método antibiograma manual de Kirby Bauer de sensibilidad a la fosfomicina y nitrofurantoina de los aislados BLEE positivos.

Código 04-13.



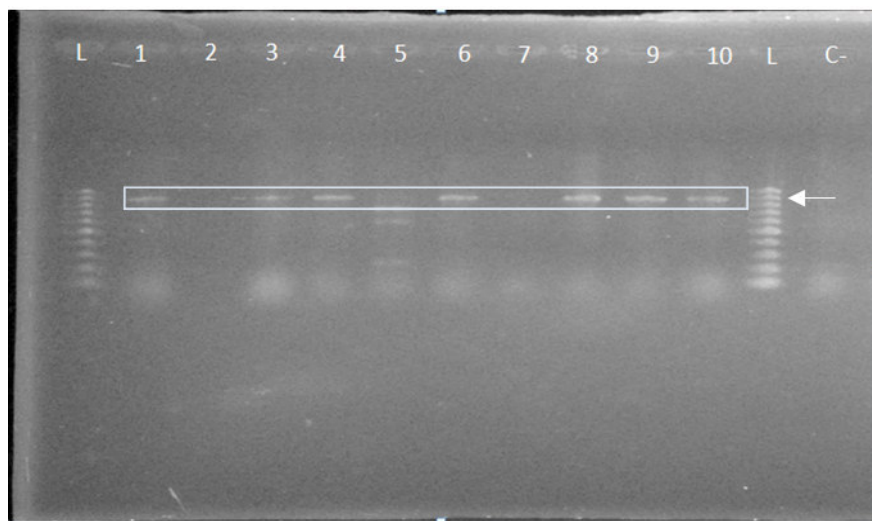
❖ TIPIFICACIÓN MOLECULAR POR PCR DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN AISLADOS BLEE EN UROCULTIVO DE GESTANTES.

Se recuperaron un total de 10 aislados productores de BLEE luego del almacenamiento a -20°C.

Luego de la electroforesis en gel de agarosa se reveló que 7 (70%) aislamientos portaban el gen *bla*_{CTX-M1} (foto 4) y 1 (10%) tuvo el gen *bla*_{CTX-M2} (foto 5). Se observó también que el único aislamiento que poseía el gen CTX-M2 también portaba el gen CTX-M1.

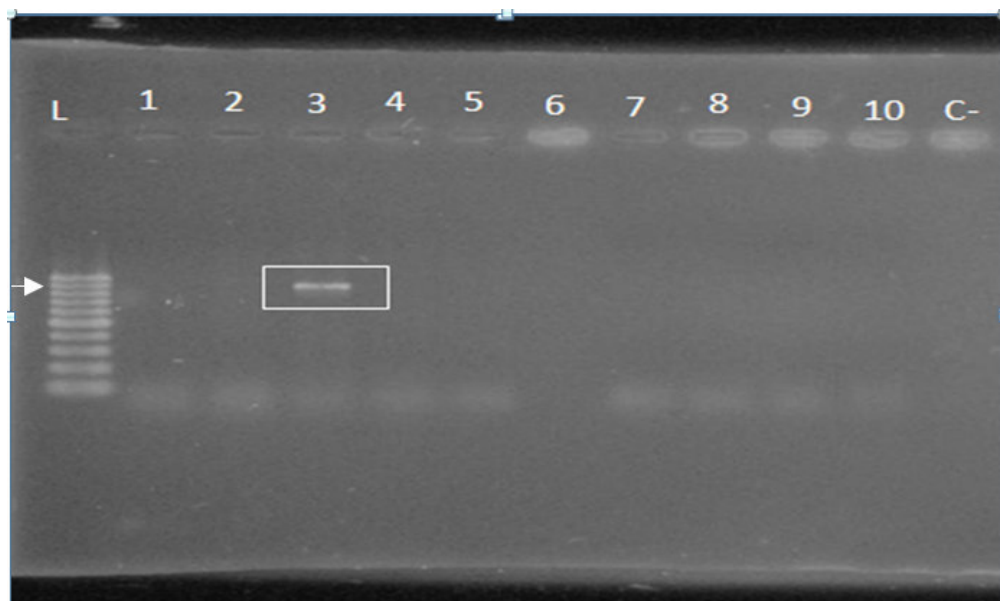
Estos resultados sugieren que los otros 3 aislamientos poseen otros genes que codifican para un grupo de enzima BLEE que no fueron evaluados en este estudio.

Foto 4. Productos de amplificación de PCR para el grupo de genes *bla*_{CTX-M1}



*L: Ladder DNA 100 pb. C- control negativo. Carriles 1, 3, 4, 6, 8, 9 y 10 portadores del gen *bla*_{CTX-M1} (900 pb).

Foto 5. Productos de amplificación de PCR para el grupo de genes *bla*_{CTX-M2}



*L: Ladder DNA 100 pb. C- control negativo. Carril 3 portador del gen *bla*_{CTX-M2} (896 pb).

V. DISCUSIÓN

La gestación es un estado en el cual se producen cambios anatómicos y fisiológicos en el tracto urinario de la mujer, ello contribuye de alguna manera a la propensión de adquirir una infección al tracto urinario (ITU).

En el presente estudio las bacterias gram negativas fueron predominantes, con la *Escherichia coli* como el uropatógeno más común (65.8%). Otros estudios también reportan a *Escherichia coli* como el principal patógeno causante de ITU en población gestante con porcentajes de hallazgos que van del rango de 42% a 64%^{11, 30, 33-38}.

En el único estudio nacional encontrado sobre sensibilidad antimicrobiana en urocultivo de gestantes, Motta³⁹ (2005) halló también como principal agente en las ITU a la *Escherichia coli* en un 68%, lo cual indica que en nuestro medio la *Escherichia coli* sigue siendo la bacteria más frecuentemente hallada en los urocultivo de gestante, manteniendo su frecuencia porcentual de hallazgo.

Resistencia a penicilinas y cefalosporinas

Las penicilinas y cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación son clasificadas en la categoría B (Anexo 5) para la Food and Drug Administration⁴⁰ (FDA), es por ello que se les cataloga como las más seguras en el uso contra infecciones en gestantes.

Motta, en su estudio no evaluó la presencia de BLEE en sus aislados, sin embargo menciona resistencias muy bajas para las cefalosporinas que va en un rango de 23%

para cefalosporinas de primera generación y 0% para cefalosporinas de cuarta generación.

En el presente estudio con respecto a la detección de betalactamasas de espectro extendido se manifiesta una alarmante prevalencia del 38.8% la cual es comparable con estudios realizados en los países como la India la cual manifiestan una prevalencia entre 44% y 35.9%^{29, 30}.

Podemos inferir entonces que en nuestro medio la resistencia a los betalactámicos en gestantes va en creciente y acelerado aumento por la presión selectiva que se ejerce con el uso de estos antimicrobianos la transferencia horizontal de genes de resistencia; correlacionándose también con los estudios realizados en la India.

La combinación de betalactámico e inhibidor de betalactamasa representada en este estudio por la ampicilina/sulbactam no cambió en mucho la situación de susceptibilidad de los aislados ya que se encontró 93% de resistencia a este antibiótico.

Este hecho marca el limitado uso de los betalactámicos en el manejo de pacientes obstétricas por la presencia que va ejerciendo la producción de BLEE en los aislados bacterianos, ya que siguiendo estos estudios *in vitro* no podrían usarse ninguna penicilina ni cefalosporina ni monobactam como el aztreonam en el tratamiento de ITU en gestantes.

Resistencia acompañante a fluoroquinolonas

En Colombia, Ferreira (2005)³⁷ en su estudio de urocultivo en gestantes encontró una resistencia de 7% frente a ciprofloxacino; en Perú Motta halló una resistencia de 15%. En los pocos trabajos realizados en la India (2012)^{11, 30, 41}, se muestra un alto porcentaje de resistencia a ciprofloxacino (rango entre 62.5% a 80%).

En nuestro estudio resalta la figura de los patrones de susceptibilidad que se encuentran en las cepas BLEE positivas, mostrándose una resistencia marcada a las fluoroquinolonas (85%), representadas por el ciprofloxacino.

En los trabajos realizados por Ferreira y Motta, ambos publicados en el año 2005, no se especifica el estudio de resistencias acompañantes en BLEE, solo en los urocultivos de gestantes en general.

El probable abuso en el uso de las fluoroquinolonas ha hecho que actualmente en nuestro estudio se vea tan incrementado el porcentaje de resistencia a este antibiótico asociado a la presencia de BLEE.

Los porcentajes de resistencia publicados en la India (año 2012) se correlacionan mejor a los hallados en el presente estudio, probablemente por la contemporaneidad, en la que la resistencia a fluoroquinolonas asociadas a BLEE se ha propagado internacionalmente.

A pesar de que se encuentra clasificada en la categoría C de la FDA, las fluoroquinolonas también son usadas en ITU gestacional. Ahora es también de preocupación la resistencia a este grupo de antibióticos ya que la presencia de BLEE limita más su uso.

Resistencia acompañante a aminoglucósidos.

Respeto a los aminoglucósidos en el presente estudio no se observó resistencia contra la amikacina (0%), sin embargo sí se observó resistencia a la gentamicina (85%).

Motta indica una resistencia también del 0% frente a amikacina y de 8% para gentamicina.

La nula resistencia a amikacina es explicable porque tiene una mayor estabilidad frente a las enzimas modificadoras, es considerado un antibiótico de reserva, así como también debido al poco uso de esta frente a infecciones en gestantes, ya que son causantes de efectosototóxicos y nefrotóxicos en el feto⁴²; por ello son ubicadas en la categoría D de la FDA.

En el caso de la gentamicina está ubicada en la categoría C de la FDA, con lo cual ha sido usado en gestantes y con mayor frecuencia en otro grupo de pacientes, esto ha llevado a que en la actualidad presente mayores niveles de resistencia, otro hecho es que la gentamicina presenta una estructura susceptible a modificación enzimática.

Resistencia acompañante a carbapenems.

Se observa también que en nuestro estudio existe una nula resistencia a los carbapenems representado por el imipenem (0%), lo cual es comprable con trabajos similares realizados en la India^{11, 22, 41} y el estudio realizado por Ferreira³⁷ y Motta³⁹, en los cuales también se muestra 0% de resistencia a los carbapenems; sin embargo, nuevamente el criterio de inocuidad hacen que el uso en gestantes sea limitado; ya que esta clasificados en la categoría C de la FDA.

Resistencia acompañante a fosfomicina.

La fosfomicina, clasificada en el grupo B de la FDA, presentó una muy buena actividad frente a las bacterias aisladas productoras de BLEE (5% de resistencia), esto también se correlaciona con estudios en los que investigan la sensibilidad a fosfomicina en cepas

productoras de BLEE aisladas justamente en urocultivos en población general, en las cuales se observa muy poca resistencia asociada (en el rango de 6% y 3%)^{42, 43}.

La baja tasa de resistencia a fosfomicina podría explicarse por su uso exclusivo en humanos y su única indicación como tratamiento en monodosis de la ITU no complicada, que dificulta la aparición de mutantes resistentes o la diseminación de resistencia mediada por plásmidos^{44, 45}. Esto la convierte en un candidato para el tratamiento en las ITU no complicadas, ahora bien con el grupo de las gestantes debe tenerse en cuenta que no puede ser administrada los primeros 3 meses de embarazo ya que puede ocasionar problemas en la organogénesis del feto¹¹.

Resistencia acompañante a nitrofurantoina.

Las cepas *Escherichia coli* productoras de BLEE presentaron frente a la nitrofurantoina (categoría B de la FDA) en este estudio una baja resistencia (11%), lo cual se relaciona también con los estudios en la India³⁰, Colombia³⁷ y Perú³⁹ (10%, 20% y 17% respectivamente) es por ello que se podría presentarse como una de las primeras líneas de tratamiento contra ITU en gestantes así como también en un tratamiento empírico, hasta esperar el urocultivo.

Tipificación molecular de aislados BLEE recuperados.

Finalmente se observó el gran porcentaje de cepas productoras de BLEE que portaban el grupo de genes CTX-M1, este resultado también se correlaciona con estudios que indican la gran prevalencia de este grupo de genes en América del Sur⁴⁶ y su emergencia en el mundo en pacientes en general⁴⁷.

Este hallazgo es también de importancia epidemiológica en la distribución de clones de bacterias que produjeron ITU en las gestantes en nuestro contexto de estudio,

produciéndose probablemente una diseminación horizontal entre las gestantes. Lamentablemente los pocos estudios sobre resistencia antimicrobiana elaborados a partir de urocultivos de gestantes no presentan resultados sobre investigación de genes que codifican para BLEE.

VII.CONCLUSIONES

- ❖ La prevalencia de aislados bacterianos productores de BLEE en aislados de urocultivos proveniente de gestantes en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen durante el periodo marzo – octubre del 2012 frente a todos los aislamientos que mostraron crecimiento para enterobacterias de urocultivos en gestantes fue del 38.8%.
- ❖ Se mostraron altos niveles de resistencia de las cepas BLEE frente a las fluoroquinolonas, la gentamicina y la combinación betalactámico/inhibidor de betalactamasa.
- ❖ Se encontró buena susceptibilidad bacteriana frente a la nitrofurantoina y la fosfomicina, pudiendo convertirse en candidatos para el tratamiento empírico en ITU de gestantes.
- ❖ Se halló una importante prevalencia del grupo de genes *bla*_{CTX-M1} en las bacterias recuperadas productoras de BLEE, evidenciando la distribución de este grupo de genes que codifican para BLEE en aislados bacterianos provenientes de urocultivo de gestantes.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios multicéntricos con la misma temática en los principales hospitales materno – infantiles para evaluar la presencia de BLEE en estas pacientes gestantes.
- Realizar estudios de epidemiología molecular a las cepas de gestantes para detectar la clonalidad de las bacterias, los genes implicados y su distribución en pacientes ambulatorias y hospitalizadas.
- Realizar estudios más profundos sobre resistencia a fosfomicina en relación a aislados BLEE.
- Realizar estudios en gestantes con infección urinaria con aislados productores de BLEE que hayan sido tratadas con betalactámicos.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Evan B. Cohn and Anthony J. Schaeffer, "Urinary Tract Infections in Adults". TheScientificWorldJOURNAL, 2004; vol. 4: 76-88.
2. Hernando Avendaño L. Nefrología Clínica. 3ª ed. Madrid, España: Médica Panamericana S.A.; 2008.
3. Stamm WE, Hooton TM. Management of urinary tract infections in adults. New Engl J Med.1993;329(18):1328-1334.
4. Koneman - Diagnóstico Microbiológico 6ª edición Editorial Médica Panamericana 1691 pag. año 2006.
5. Quiroga G, Robles R, Ruelas A, Gómez A.*Bacteriuria asintomática en mujeres embarazadas*. Una amenaza subestimada. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2007; 45 (2): 169-172.
6. Peleg A, Hooper DC, Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. N Engl J Med, 2010; 362(19): 1804-18013.
7. Maguiña M, Ramos W. Características de las maternas notificadas por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la Mortalidad Materna del Perú durante el período1999-2005. Resumen aceptado para el Global Congress of Maternal and Infant Health; Barcelona 2010.
8. Connolly, AM. Thorp, J. Infections in 3. Urology: Urinary Tract Infections in Pregnancy. Urologic Clinics of North América; 1999; 26(4): 779-787.
9. FANEITE P, GOMEZ R. Amenaza de parto prematuro e infección urinaria. Rev. Obstet Ginecol Venez, 2006; 66(1): 1-6.

10. Abarzúa CF, Zajer C, Donoso B, Belmar J, Riveros JP, González BP, Oyarzún E. Reevaluación de la sensibilidad antimicrobiana de patógenos urinarios en el embarazo. *Rev chil obstet ginecol* 2002; 67(3): 226-231
11. Rizvi M, Khan F, Shukla I, Malik A, S. Rising prevalence of antimicrobial resistance in urinary tract infections during pregnancy : Necessity for exploring newer treatment options. *J Lab Physicians* 2011;3 :98-103.
12. Rossi, F; Andreazzi, D.B. Resistencia Bacteriana: Interpretando el antibiograma. 1ra edición. Editorial Atheneu. Año 2006.
13. Blanzaco, P; Flamigietti A. Curso de Microbiología Clínica: Antimicrobianos. 2da edición. Modulo 4. Año 2009.
14. Daza R.M. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. España. 1988; 22(3): 24-27.
15. A. Greca. La resistencia bacteriana y los nuevos antibióticos. VI Jornadas Internacionales de Medicina Interna - X Jornadas de Medicina Interna del Litoral Argentino Enfermedades Regionales. Universidad Nacional de Rosario. [serie en internet] [citado 24 noviembre 2012]; Disponible en: <http://www.amir.org.ar/ExPresidentes/Greca%20Resistencia%20bacteriana%20y%20nuevos%20atb.pdf>
16. Livermore D. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):557–84.
17. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Pública.* 2011;30(6):519–28.
18. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement M100-S21. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2011.
19. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):867-78.

20. Lizet Lezameta, Edgar Gonzáles-Escalante, Jesús H. Tamariz. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2010; 27(3): 345-51.
21. García P. Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro. Rev Chil Infect. 2002; 19 Supl. 2: 96-100.
22. BioMérieux®, S.A. Información del producto VITEK® 2 Systems. Versión: 24461. <https://www.mybiomerieux.com>
23. MacLowry, JD, and HH Marsh. 1968. Semi-automatic microtechnique for serial dilution antibiotic sensitivity testing in the clinical laboratory. J. Lab.Clin. Med. 1968;72:685-687.
24. Gerlach, E.H. Microdilution 1:A Comparative Study.Current Techniques for Antibiotic Susceptibility Testing. 63-76.A. Balows(ed.)CharlesC.Tomas, Springfield Illinois, 1974.
25. BioMérieux®, S.A. AST-GN45 Tarjeta de suceptibilidad para gram negativos.Ref. 411920. Versión: 9301143. <https://www.mybiomerieux.com>
26. Bobin F, Delmas, J, Schweitzer C, Bonnet, R. Evaluation of the Vitek-2 extended-spectrum β -lactamase test against non-duplicate strains of Enterobacteriaceae producing a broad diversity of well-characterised β -lactamases. Clinical Microbiology and Infection. 2008; 14: 148–154.
27. Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung P, Varón C, Moldes L, et al. Comparación entre las pruebas para la detección de betalactamasas de espectro extendido de los sistemas Vitek2 y Phoenix. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(10):566–570.
28. Ve´ronique Dubois, Bertille De Barbeyrac, Anne-Marie Rogues, Corinne Arpin, Laure Coulange, Catherine Andre, FatimaM'Zali , Francis Megraud and Claudine Quentin. CTX-M-producing *Escherichia coli* in a maternity ward: a

likely community importation and evidence of mother-to-neonate transmission. Clin Infect Dis 2001; 32 suppl 2: 94–103.

29. Meher Rizvi, Fatima Khan, Indu Shukla, Abida Malik, Shaheen. Rising Prevalence of Antimicrobial Resistance in Urinary Tract Infections During Pregnancy: Necessity for Exploring Newer Treatment Options. J Lab Physicians. 2011;3(2):98-103.
30. Sabharwal ER. Antibiotic susceptibility patterns of uropathogens in obstetric patients. North Am J Med Sci 2012;4:316-9.
31. Hootson TM. Recurrent urinary tract infection in women. Int J Antimicrob Agents 2001;17:259-68.
32. Yamane, Taro. 1967. Statistics: An Introductory Analysis, 2nd Ed. Pag.886, New York: Harper and Row.
33. Okonko IO, Ijandipe LA, Iusanya AO, Donbraye-Emmanuel OB, Ejembi J, Udeze AO, et al. Incidence of urinary tract infection (UTI) among pregnant women in Ibadan, south-western Nigeria. Afr J Biotech 2009;8:6649-57.
34. Pais P, Khurana R, George J. Urinary tract infections: A retrospective survey of causative organisms and antibiotics prescribed in a tertiary care setting. Indian J Pharmacol 2002;34:278-80.
35. Okonko I.O., Donbraye-Emmanuel O.B., Ijandipe L.A., Ogun A.A., Adedeji A.O., Udeze A.O. Antibiotics Sensitivity and Resistance Patterns of Uropathogens to Nitrofurantoin and Nalidixic Acid in Pregnant Women with Urinary Tract Infections in Ibadan, Nigeria. Middle-East Journal of Scientific Research 2009; 4 (2): 105-109.
36. Pallavi J.; Junainah A.H.; Mathan M.; Mohamed R.; Rajasegar A.; Haniza H. Microbial spectrum and antibiotic susceptibility of uropathogens causing urinary tract infection in pregnant women. South Asian Journal of Experimental Biology 2011; 1 (2): 77-80.
37. Ferreira F, Olaya S, Zúñiga P, Angulo M. Infección urinaria durante el embarazo, perfil de resistencia bacteriana al tratamiento en el Hospital General de Neiva, Colombia. Rev Colomb Obstet Ginecol ;56(3): 239-243.

38. Hamdan Z, Abdel H, Salah K, Ishag A. Epidemiology of urinary tract infections and antibiotics sensitivity among pregnant women at Khartoum North Hospital. *Ann ClinMicrobiolAntimicrob*. 2011; 10: 2.
39. Motta Jiménez M. Sensibilidad antibiótica y características clínicas asociadas de las bacterias causantes de ITU en gestantes. HNDAC. Enero - marzo 2005. [tesis para optar el título profesional de especialista en Gineco Obstetricia.]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2005.
40. FDA Consumer magazine. Volume 35, Number 3 May-June 2001.
41. Parveen SS, Reddy SV, Rao MV, Rao JR. Uropathogens and their drug susceptibility patterns among pregnant women in a teaching hospital. *Ann Biol Res* 2011; 2:516-21.
42. Llaca V, Fernández A. Enfermedades infecciosas, Obstetricia clínica, C. México, McGraw Hill , 4 ed, 2000:212.
43. M. S. Hernández, et al. Actividad *in vitro* de fosfomicina frente a enterobacterias de origen urinario productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Esp Quimioter* 2009;22(1):25-29.
44. De Cueto M, et al. Actividad de fosfomicina sobre cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24(10):613-6
45. Marchese A, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM. In vitro activity of fosfomycin against Gram-negative urinary pathogens and the biological cost of fosfomycin resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22:853-9.
46. Casellas José María. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Pública*[serial on the Internet]. 2011 Dec [cited 2012 Nov 25] ; 30(6): 519-528. Available from: http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892011001200004&lng=en.
47. Rodríguez Baño J, Navarro M D, Romero L, Muniain M A, de Cueto M, Ríos M J, et al. Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *Clin Infect Dis* 2006; 43 (11): 1407-14.

ANEXO 1

CLASIFICACION DE LAS BETALACTAMASAS PROPUESTO POR BUSH Y JACOBY 2010

Grupo Bush Jacob y (2009)	Clase Molecular*	Sustratos	Inhibido por		Principales características	Enzimas representantes
			CLAV.	EDTA		
1	C	Cefalosporinas	-	-	Mejor hidrólisis de cefalosporinas que de benzylpenicilina	AmpC, P99, ACT-1, CYM-2, FOX-1, MIR-1.
1e	C	Cefalosporinas	-	-	Hidrólisis incrementada hacia ceftazidima y otros oximinobeta-lactámicos	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	+	-	Mejor hidrólisis de benzylpenicilina que de cefalosporinas	PC1
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas	+	-	Hidrólisis similar de benzylpenicilinas y de cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos.	+	-	Hidrólisis incrementada hacia ceftazidima y otros oximinobeta-lactámicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	-	-	Resistencia a ácido clavulánico, Sulfabactam y tazobactam.	TEM-30, SHV-10
2c	A	carbenicilina.	+	-	Hidrólisis incrementada de la Carbenicilina.	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilinas, cefepime	+	-	Hidrólisis incrementada de la carbenicilina, cefepime y ceftiprome	RTG-4
2d	D	cloxacilina	+/-	-	Hidrólisis incrementada de la cloxacilina o de la oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	+/-	-	Hidrólisis de cloxacilina o oxacilina y oximino-beta-lactámicos	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenems	+/-	-	Hidrólisis de cloxacilina o oxacilina y carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibido por ácido clavulánico pero no por aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenems.	+/-	-	Hidrólisis incrementada de carbapenems, oximino-beta-lactámicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Carbapenems.	-	+	Hidrólisis de espectro extendido incluyendo carbapenems pero nomonobactams.	IMP-1, VIM-1, CrA, IND-1.
	B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenems	-	+	Hidrólisis preferente de carbapenems	CphA, Sfh-1

CLAV: ácido clavulánico. EDTA: etilen-diamin-tetra-acético. ND: no determinado. V: variable

*Clase molecular según clasificación de Ambler.

ANEXO 2

PUNTOS DE CORTE RECOMENDADOS POR LA CLSI 2011 PARA LA DETECCIÓN DE BETALACTAMAS DE ESPECTRO EXTENDIDO

DISCO (CONCENTRACIÓN)	HALO (mm)
CEFPODOXIMA (10 µg)	≤17
CEFOTAXIMA (CTX) (30 µg)	≤27
CEFTRIAXONA (CRO) (30 µg)	≤25
CEFTAZIDIMA (CAZ) (30 µg)	≤22
AZTREONAM (AZT) (30 µg)	≤27

ANEXO 3.

FICHA PARA DATOS MICROBIOLÓGICOS PACIENTES GESTANTES.

Ficha Nº.....

DATOS MICROBIOLÓGICOS PACIENTES GESTANTES.

CODIGO	TIPO DE PACIENTE	BLEE (+/-)	ESPECIE BACTERIANA	SENSIBILIDAD ANTIBIOTICA																
				AMK	AMC	AMP	AZT	CFZ	FEP	CTX	CAZ	CRO	CXM	CIP	ERT	GEN	IPM	LV X	SXT	NIT

LEYENDA:

R: RESISTENTE

I: INTERMEDIO

S: SENSIBLE

H: PACIENTE HOSPITALIZADO

A: PACIENTE AMBULATORIO

Fecha de procesamiento:

SIGLAS DE ANTIBIOTICOS

AMK: Amicacina

AMC: Amoxicilina/ac. clavulánico

AMP: Ampicilina

ERT:Ertapenem

AZT: Aztreonam

CFZ: Cefazolina

FEP: Cefepime

CIP: Ciporfloxacina

CTX: Cefotaxima

CAZ: Ceftazidima

CRO: Ceftriaxona

CXM: Cefuroxima

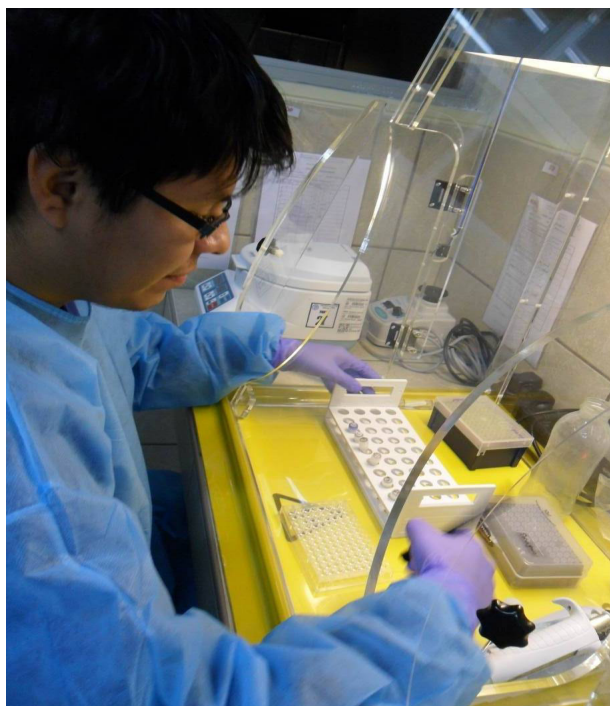
IPM: Imipenem

LVX: Levofloxacina

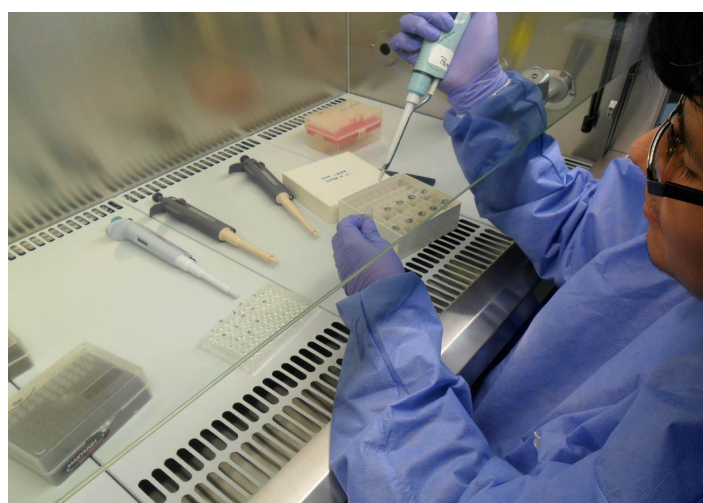
SXT: Trimetoprima-sulfametoxazol

ANEXO 4

ANEXO 4.1. Elaboración del Máster mix en el laboratorio de epidemiología molecular y genética del IMT-DAC.



ANEXO 4.2. Adición de DNA total bacteriano a la Máster mix en el laboratorio de epidemiología molecular y genética del IMT DAC.



ANEXO 5

CATEGORÍA DE RIESGO DE FÁRMACOS EN EL EMBARAZO SEGÚN LA FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION)

CATEGORIA	RIESGO
A	Estudios adecuados y bien controlados realizados en mujeres embarazadas no muestran riesgos para el feto en cualquier trimestre del embarazo.
B	Los estudios en animales no han revelado evidencia de efectos adversos para el feto, sin embargo, no existen estudios adecuados y bien controlados en mujeres embarazadas. O Los estudios en animales han demostrado un efecto adverso, pero estudios adecuados y bien controlados en mujeres embarazadas no han demostrado un riesgo para el feto en cualquier trimestre.
C	Los estudios en animales han demostrado un efecto adverso pero no existen estudios adecuados y bien controlados en mujeres embarazadas. Beneficios exceden los riesgos.
D	Estudios adecuados o bien controlados en mujeres embarazadas observacionales han demostrado un riesgo para el feto. Sin embargo, los beneficios de la terapia pueden ser mayores que los riesgos potenciales.
X	Estudios adecuados bien controlados o de observación de los animales o mujeres embarazadas han demostrado evidencia positiva de anormalidades fetales o riesgos.